

氏 名 おおいし なおや  
大石 直哉

学 位 の 種 類 博 士 (医学)

学 位 記 番 号 富生命博甲第 104 号

学位授与年月日 平成 31 年 3 月 26 日

専 攻 名 認知・情動脳科学専攻

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

学位論文題目 Artificial association of memory events by optogenetic stimulation of hippocampal CA3 cell ensembles accompanied by recurrent LTP  
(海馬 CA3 領域の神経細胞集団の光遺伝学的刺激による異なる記憶イベント間の人為的連合とそれに伴う反回性経路の長期増強 )

論文審査委員

(主査) 教 授 森 寿  
(副査) 教 授 田村 了以  
(副査) 教 授 黒田 敏  
(副査) 教 授 中辻 裕司

指 導 教 員 教 授 井ノ口 馨

## SUMMARY

The CA3 area of the hippocampus comprises a recurrent excitatory circuit, which is thought to be important for the formation of associative memory within one brain region. However, it is unclear that the CA3 recurrent network plays an important role in the interaction between pre-stored information. We investigated whether the coincident firing of cell ensembles in one brain region, hippocampal CA3, associates distinct events.

CA3 cell ensembles responding to context exploration and during contextual fear conditioning were labeled with channelrhodopsin-2 (ChR2)-mCherry. The synchronous activation of these ensembles induced freezing behavior in mice in a neutral context, in which a foot shock had never been delivered. The recall of this artificial associative fear memory was context specific. In vivo electrophysiological recordings showed that 20-Hz optical stimulation of ChR2-mCherry-expressing CA3 neurons induced long-term potentiation at CA3-CA3 synapses.

Altogether, these results demonstrate that the synchronous activation of ensembles in one brain region, CA3 of the hippocampus, is sufficient for the association of distinct events.

## 【論文審査の結果の要旨】

### 研究目的：

記憶機能に重要な海馬では、歯状回、CA3 領域、CA1 領域の順に神経情報伝達が行われる。特に CA3 領域の錐体神経細胞は、反回性経路と呼ばれる再帰的な回路を形成しており連合学習に重要であると考えられている。近年、記憶は学習時に活動した神経細胞集団に蓄えられることが分かってきたが、CA3 領域単独で、既に蓄えられた情報の相互作用で、新たな連合記憶が形成できるかどうかは不明である。また、神経細胞では同期活性化を繰り返すことにより、記憶の基礎過程と考えられるシナプス伝達の長期増強 (LTP) が生じる。これらの背景のもと、大石君は、CA3 領域の機能を明らかにするため、2つの異なる記憶イベントで活性化された神経細胞集団を光遺伝学的手法で同期活性化させ、独立した記憶イベント間の連合が生じるか、行動学的に検証した。更に、光遺伝学的な同期活性化により CA3 領域の反回性経路に LTP が生じるか、電気生理学的に検証した。

### 材料と方法：

#### 1) 遺伝子操作マウス系統の作製

学習時に活動した神経細胞集団を特異的に操作するために、神経活動マーカーである *c-fos* プロモーターでドキシサイクリン (Dox) 依存的転写因子 *tTA* を発現するマウスと、CA3 領域の錐体神経細胞特異的な遺伝学的操作を行うために *KA1-Cre* マウスを交配し、*c-fos tTA/KA1-Cre* ダブルトランスジェニックマウスを作製した。このマウスに、*tTA* 活性と *Cre* 活性に依存して光刺激により開閉する陽イオンチャネルタンパク質(*ChR2*) を発現するアデノ随伴ウィルスベクターを導入した。このマウスでは、Dox 非存在下の学習で活性化した CA3 領域の神経細胞のみに、レーザー光照射による神経活動を誘起できる。

#### 2) 行動学的解析

上記の方法で作製したマウスを用い、第1日目に丸い筒での探索、第2日目に四角い箱で電気ショックを与え、第3日目に飼育ケージで2つのイベント時に活動した CA3 領域の神経細胞集団にレーザー光の高頻度パルスを与え同期活性化させた。マウスを、第4日目に丸い筒、第5日目に四角い箱、第6日目に初めて体験する箱の順に入れ、それぞれの場合の恐怖反応をすくみ行動で計測評価した。

#### 3) 電気生理学的解析

上記の行動解析の際に用いたレーザー光照射による神経細胞集団の活性化により、CA3 領域の反回性経路に LTP が生じるか検証するため、麻酔下マウスの CA3 領域より *in vivo* フィールド興奮性シナプス後電位の記録を行った。

結果：

1) 本研究で用いたマウス系統の CA3 領域では、Dox 非存在下で2つのイベントを体験した場合に、ChR2を発現する神経細胞は有意に増加した。

2) 行動学的解析では、第4日目の丸い筒のテストで、レーザー光照射群では照射を行なわなかった対照群に比べ有意に高い恐怖反応を示した。実際には恐怖体験をしていない丸い筒で恐怖反応を示したことから、CA3領域の2つの異なる記憶イベントを保持する神経細胞集団のレーザー光照射による同期活性化により、記憶の連合を引き起こすことが示された。一方で、第6日目の初めて体験する箱の中では両群の恐怖反応に差はなく、恐怖記憶は文脈特異的であった。

3) 電気生理学的解析で、行動学的解析の際に用いた神経細胞集団のレーザー光照射による同期活性化により CA3 の反回性経路で LTP が生じることが示された。

総括：

本研究で大石君は、海馬 CA3 領域の2つの異なる記憶イベントに対応する神経細胞集団を光遺伝学的方法で同期活性化すると、新たな連合記憶が形成されることを行動学的解析で示した。更に神経細胞集団の光遺伝学的な同期活性化は、CA3 領域で LTP を引き起こした。これらの結果から、大石君は、光遺伝学的方法による CA3 領域での新たな連合記憶の形成は、CA3 領域の特徴である反回性経路を介し神経伝達効率の上昇が起き、1つの記憶イベントに対応した細胞集団の活動が、もう1つの記憶イベントに対応した細胞集団の活動を誘起したためであると考察した。

以上のことから、本研究は CA3 の神経細胞集団の活動を制御し記憶の操作を行った初めての研究報告であり新規性が高い。更に本研究は、外界からの感覚刺激の入力無しに、CA3 単独の脳領域内で蓄えられた情報間の相互作用により新たな連合記憶を形成し得ることを初めて明らかにした点は、新規性が高く、医学における学術的重要性も高い。この研究の成果は、イメージトレーニングや過誤記憶等の、ヒトの高度な脳機能と病態の解明にもつながると考えられ、今後の臨床的発展性が期待できる。

以上より本審査会は、本論文を博士（医学）の学位に十分値すると判断した。